

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08941

研究課題名(和文) 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)病原性発現機構の分子ウイルス学的解剖

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism of neuropathogenicity of a subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus

研究代表者

伊藤 正恵 (ITO, Masae)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10201328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：亜急性硬化性全脳炎(subacute sclerosing panencephalitis, SSPE)ウイルスの神経病原性発現分子機構の全容を明らかにするため、SSPEウイルスKobe-1株ゲノム上の全変異について解析した。P、F、HおよびL蛋白質にはそれぞれの蛋白質機能を抑制するアミノ酸変異が同定され、それらの変異を持つ組換えウイルスは神経細胞での増殖を減弱させた。Kobe-1株は、FおよびM蛋白質に神経病原性に必須のアミノ酸変異を得て脳内での増殖を亢進し発症へと至るが、麻疹ウイルスからSSPEウイルスへの変異の過程で、持続感染時期に神経細胞での増殖を抑制する変異が必要であると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SSPEは、麻疹治癒後も麻疹ウイルスが脳内に持続感染し、5から10年を経て稀に発症する致死性の疾患である。発症前の変異途上のウイルスを得ることはできず、本研究において、発症後に分離されたウイルスのゲノム上の全変異を解析することにより、初めて持続感染の分子機構を推察するに至った。今後、他のSSPEウイルス株において同様の解析を積み重ね、病原性発現機構の全体像が明らかとなれば、未だ科学的根拠が不明なワクチン株がSSPEを発症しない理由の解明へと展開でき、同時に、治療法や治療薬開発の可能性につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Characterization of the all mutations detected in the genome of the Kobe-1 strain of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus was performed with the aim to unravel the whole aspect of the molecular mechanism through which a parental measles virus evolved into an SSPE virus in the brain of a patient taking several years. In the P, F, H and L proteins, amino acid mutations that suppress the function of each viral protein were identified; recombinant viruses bearing those mutations decreased their propagation in neuronal cells. At the stage of disease onset, the Kobe-1 strain should have increased its cell-to-cell fusion ability obtaining mutations in the F and M proteins, which accelerated viral spread in the brain. Mutations that cause the opposite effect on the virus to reduce its growth might have been indispensable for the measles virus to establish persistent infection just after invasion into the brain before acquiring enhanced cell-to-cell fusion ability.

研究分野：ウイルス学

キーワード：SSPEウイルス 神経病原性 持続感染 麻疹ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 亜急性硬化性全脳炎 (subacute sclerosing panencephalitis ; SSPE) は、麻疹を経験した小児が、通常通り治癒した後 5~10 年を経て、きわめて稀に発症する致死的疾患である。知能の低下や性格の変化で気付かれることが多いが、Stage1 から 4 へと大脳機能が進行性に冒され死に至るといふ悲劇的な経過をたどる。脳脊髄液中に高力価の抗麻疹ウイルス抗体が認められ、発症後の脳内病巣から変異麻疹ウイルス (SSPE ウイルス) が分離されるので、麻疹ウイルスの脳内感染によるものと考えられている¹⁾。

(2) SSPE には、正常に回復した麻疹感染から平均 6 年間という長い持続感染期間を経て突然発症し、発症後は急速に進行増悪する、という特徴があり、発症後に分離された SSPE ウイルスは、ゲノム上に多数の変異を蓄積している。発症要因としては、ウイルス F 蛋白質の融合活性の亢進により、細胞融合を介して神経細胞で感染が拡大して神経病原性を発現することが挙げられている²⁾。

(3) 一方、SSPE という疾患の性格上、発症前に麻疹ウイルスから SSPE ウイルスへの変異途上にあるウイルスを捉えることは不可能であり、持続感染の成立機構を明らかにする手段は見出されていない。このことが、SSPE の病原性発現機構の全容を分子レベルで明らかにすることを困難にしている。

2. 研究の目的

(1) SSPE ウイルスの変異は、持続感染から発症へと至る過程の痕跡と理解することができる。そのゲノム上に残された変異を、分子ウイルス学的に解剖して網羅的に解析する。

(2) SSPE ウイルスの変異を導入した様々な組換え麻疹ウイルスを人工的に作製して変異途上にあると考えられるウイルスのライブラリーを創出し、麻疹ウイルスから SSPE ウイルスへと至る過程を再現実証する。構築した変異モデルを用いて、持続感染成立から発症へと至る病原性発現機構を推察する。

3. 研究の方法

(1) SSPE ウイルスとして Kobe-1 株を用いる。多くの SSPE ウイルスは、全ゲノム中のアミノ酸置換が親株の麻疹ウイルスに対し 100 を超える。その中で Kobe-1 株は、変異の数が他の SSPE ウイルスに比べて 49 と極めて少なく³⁾、解析に適している。Kobe-1 株のすべての変異について、親株の麻疹ウイルス IC-B 株と比較しつつ、遊離粒子形成能、細胞融合活性誘導能、ゲノム転写・複製能、ウイルス増殖性、神経細胞指向性などについて検証し、その性格を明確化する。

(2) Kobe-1 株に認められるアミノ酸変異を単独または複数で IC-B 株に導入して組換えウイルスライブラリーを作製し、神経細胞での増殖性、さらにマウスあるいはハムスター神経病原性発現能を検証する。これらのウイルスを、IC-B 株から Kobe-1 株への変異途上の各段階に位置付けることにより、SSPE ウイルスへと至る変異の全過程のモデルの構築を目指す。

4. 研究成果

(1) F 遺伝子

Kobe-1 株の F 遺伝子は、M 遺伝子の共存下でマウス神経病原性に必須であった。F 蛋白質は IC-B 株と比較して高い融合活性を示したが、個々の変異の中には融合活性を低下させる変異が認められた(図 1)。ハムスター神経病原性を示す組換えウイルス(MFH)において、融合活性を低下させる変異を元に戻すと神経病原性が増強することが明らかとなり(図 2)、それらの変異が、ウイルスの神経細胞における増殖を抑制してハムスターに対する病原性も減弱させることが示された。脳内で感染を拡大し、より増殖能を増して SSPE 発症へと向かう過程で、これを抑制する変異が選択されることは考えにくい。融合活性を低下させる変異、中でも

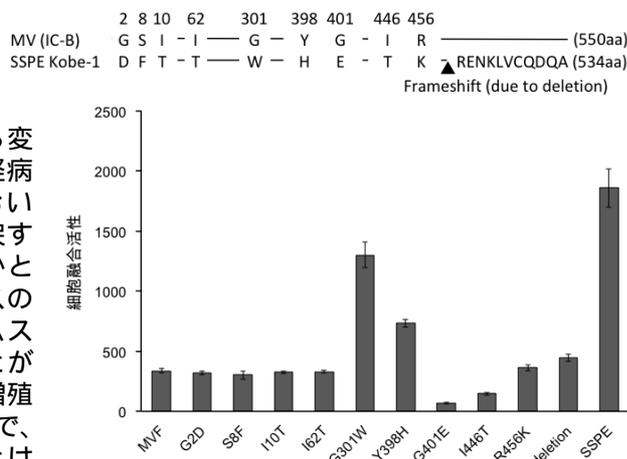


図1. F蛋白質の変異と細胞融合活性に及ぼす影響

G401E 変異は F 蛋白質量を大きく減少させており、宿主の免疫反応を回避して持続感染の成立に寄与した可能性がある。ウイルスの細胞融合能の亢進を介して神経病原性の発現を支配する F タンパク質も、持続感染の初期に融合活性を強く抑制する過程を経ることが推察される。

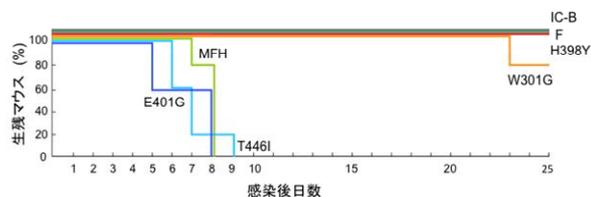


図2. ハムスター神経病原性

(2) L 遺伝子

Kobe-1 株の L 遺伝子を持つ組換えウイルスは、神経細胞での増殖、マウス神経病原性が減弱しており(図 3)、RNA 依存性 RNA 合成(RdRp)活性の低下によるものと考えられた。Kobe-1 株が SSPE 発症へ向けて変異を蓄積し神経病原性を獲得していく中で、L 蛋白質が逆行する方向に変異するとは考えにくい。L 蛋白質には RdRp 活性を特に低下させるアミノ酸変異が 3 ヶ所あり(図 4)、これらを重ね持つ L 蛋白質(Triple)は、Kobe-1 株の L 蛋白質と比較して、ウイルスの感染性粒子産生能、細胞融合能および神経細胞での増殖を強く抑制した。そこへ L 蛋白質の他の変異を追加していくと(+)、ウイルスのいずれの能力も上昇し、次第に Kobe-1 株へと近付いた(図 5)。この変異過程の

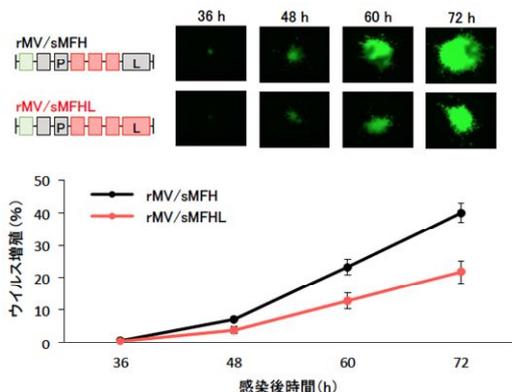


図3. Kobe-1株L蛋白質によるウイルス増殖の抑制

再構築モデルから、L 遺伝子も、まず RdRp 活性を大きく低下させる変異を得て持続感染の成立に寄与し、その後、発症へと至る時期には、RdRp 活性を増大する変異を獲得したウイルスが選択されて神経細胞での感染を拡大させるものと推察される。

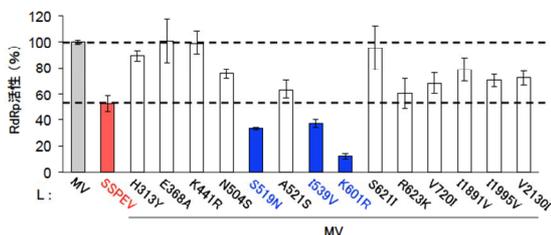


図4. L蛋白質アミノ酸変異によるRdRp活性の変化

(3) P 遺伝子

P 遺伝子のコードする P 蛋白質は、L 蛋白質の補酵素として機能する。Kobe-1 株の P 蛋白質には RdRp 活性を抑制するアミノ酸変異が複数認められ、IC-B 株と比較して RdRp 活性を大きく減弱させると同時に、ウイルスの細胞融合能ならびに神経細胞での増殖を強く抑制していた。また、マウス神経病原性を減弱する可能性が示された。

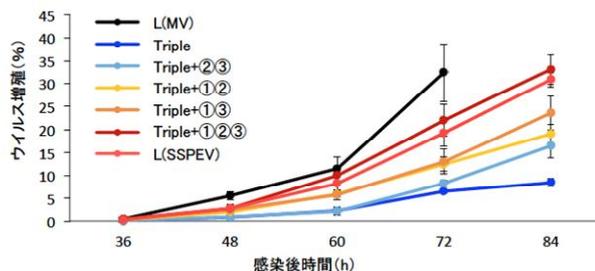


図5. 変異の蓄積によるウイルス増殖能の上昇

(4) H 遺伝子

H 蛋白質はレセプターに吸着後、F 蛋白質の融合活性を誘導する(トリガリング活性)。Kobe-1 株の H 蛋白質は IC-B 株より低いトリガリング活性を示し、ウイルスの細胞融合能および神経細胞での増殖を抑制し、マウス病原性を弱毒化させた。H 蛋白質上にはトリガリング活性を強く減弱するアミノ酸変異が見出された。

(5) M 遺伝子

Kobe-1 株 M 蛋白質は、F 蛋白質によるウイルスの神経病原性の発現に不可欠であった。3 ヶ所の変異は、いずれもウイルスの細胞融合能を上昇させた。

(6) 考察

Kobe-1 株の遺伝子上には、M 遺伝子を除き、神経細胞での増殖やマウスあるいはハムスター病原性を減弱する変異が認められた。SSPE ウイルスは、発症へと至るまでに、脳内に侵入した麻疹ウイルスが持続感染する際、ウイルス蛋白質の機能を抑制する必要があることが推察される。

< 引用文献 >

- 1) Mekki M, Eley B, Hardie D, Wilmschurst J M. Subacute sclerosing panencephalitis:

- clinical phenotype, epidemiology, and preventive interventions. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 61: 1139–1144. (2019) doi: 10.1111/DMCN.14166
- 2) Ayata M, Takeuchi K, Takeda M, Ohgimoto S, Kato S, Sharma L B, Tanaka M, Kuwamura M, Ishida H, Ogura H. The F Gene of the Osaka-2 Strain of Measles Virus Derived from a Case of Subacute Sclerosing Panencephalitis Is a Major Determinant of Neurovirulence. *Journal of Virology*, 84(21): 11189–11199. (2010) doi: 10.1128/jvi.01075-10
 - 3) Hotta H, Nihei K, Abe Y, Kato S, Jiang D-P, Nagano-Fujii M, Sada K. Full-length sequence analysis of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus, a mutant of measles virus, isolated from brain tissues of a patient shortly after onset of SSPE. *Microbiology and Immunology*, 50(7): 525–534. (2006) doi: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03822.x

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kitagawa Y, Yamaguchi M, Kohno M, Sakai M, Itoh M, Gotoh B.	4. 巻 594
2. 論文標題 Respirovirus C protein inhibits activation of type I interferon receptor-associated kinases to block JAK-STAT signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 864-877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13670	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Y, Higuchi K, Nishikawa D, Wakimoto H, Konami M, Sakamoto K, Kitagawa Y, Gotoh B, Jiang D-P, Hotta H, Itoh M.	4. 巻 102
2. 論文標題 M protein of subacute sclerosing panencephalitis virus, synergistically with the F protein, plays a crucial role in viral neuropathogenicity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001682	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto K, Sato Y, Takahashi K, Wakimoto H, Kitagawa Y, Gotoh B, Ayata M, Itoh M.	4. 巻 573
2. 論文標題 Upregulation of viral RNA polymerase activity promotes adaptation of SSPE virus to neuronal cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2022.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sato Y, Konami M, Wakimoto H, Higuchi K, Jiang D-P, Sakamoto K, Kitagawa Y, Gotoh B, Takahashi K, Hotta H, Itoh M.
2. 発表標題 Characterization of the mutations in the L protein of the Kobe-1 strain of a subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus.
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kitagawa Y, Itoh M, Gotoh B.
2. 発表標題 Middle East respiratory syndrome coronavirus ORF4b inhibits IKK γ -mediated phosphorylation of IRF7 involved in activation of the alpha interferon gene.
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本 賢人、小浪 海峰、樋口 遥、姜 大鵬、脇本 浩史、亀田 森羅、佐藤 友人、北川 善紀、後藤 敏、高橋 健一、堀田 博、伊藤 正恵.
2. 発表標題 亜急性硬化性全脳炎(SSPE)発症過程における麻疹ウイルスLタンパク質の役割.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北川善紀、野中 梨聖、高澤 博人、伊藤 正恵、後藤 敏.
2. 発表標題 MERSコロナウイルスORF4b蛋白質によるI型IFN応答経路の阻害.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 友人 (SATOHI Yuto)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂本 賢人 (SAKAMOTO Kento)		
研究協力者	綾田 稔 (AYATA Minoru)		
研究協力者	高橋 健一 (TAKAHASHI Ken-ichi)		
研究協力者	脇本 浩史 (WAKIMOTO Hiroshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関